

⑤

Int. Cl. 3:

**C 07 H 19/04**

⑯ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**DEUTSCHES PATENTAMT**



⑪

## **Offenlegungsschrift 29 20 592**

⑯

Aktenzeichen: P 29 20 592.3

⑯

Anmeldetag: 21. 5. 79

⑯

Offenlegungstag: 4. 12. 80

⑯

Unionspriorität:

⑯ ⑯ ⑯

—

⑯

Bezeichnung: Verfahren zur Reinigung von Riboflavin

⑯

Anmelder: Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. (V.St.A.)

⑯

Vertreter: Abitz, W., Dr.-Ing.; Morf, D., Dr.; Gritschneider, M., Dipl.-Phys.;  
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑯

Erfinder: Epstein, Albert, Edison; Graham, Glen, Stockton;  
Sklarz, William Arthur, Edison; N.J. (V.St.A.)

21. Mai 1979

DR.-ING. WALTER ABITZ  
 DR. DIETER F. MORF  
 DIPL.-PHYS. M. GRITSCHNEDER  
 Patentanwälte

München,  
 Postanschrift / Postal Address  
 Postfach 860109, 8000 München 86  
 Pienzenauerstraße 28  
 Telefon 983222  
 Telegramme: Chemindus München  
 Telex: (0) 523992

15754IB

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1) Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem Riboflavin aus einer Riboflavin enthaltenden Fermentationsbrühe, d a- durch gekennzeichnet, dass man

- a) die Brühe, wenn die Fermentationsausbeute sich etwa am Maximum befindet, etwa 15 bis etwa 45 Minuten auf etwa 50 bis etwa 65°C erwärmt,
- b) der Fermentationsbrühe ein Wasservolumen zusetzt, welches nicht zur Auflösung suspendierter Feststoffe in der Brühe ausreicht, jedoch für die Optimierung der Trennung ausreicht, indem es sowohl zuvor aufgelöste Feststoffe verdünnt als auch eine Zentrifugentrennung fester, suspendierter Teilchen, die eine geringere Dichte als kristallines Riboflavin aufweisen, gestattet,
- c) die zugesetzte Wassermenge enthaltende Fermentationsbrühe zur Bildung eines Schlammes zentrifugiert,
- d) den Schlamm mit einer Wassermenge resuspendiert, welche nicht zur Auflösung suspendierter Feststoffe aus-

reicht, jedoch zur Optimierung der Abtrennung fester Teilchen, welche eine geringere Dichte als kristallines Riboflavin haben, ausreicht, und

e) den resuspendierten Schlamm zentrifugiert, um ein gereinigtes Riboflavin enthaltendes Zentrifugat, welches als solches als Tierfutterzusatz geeignet ist, zu gewinnen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die der Fermentationsbrühe zugesetzte Wassermenge etwa 25 bis etwa 100 Vol.-% der Ausgangsmenge der Fermentationsbrühe beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das der Fermentationsbrühe zugesetzte Wasservolumen etwa 1/3 bis etwa die Hälfte des Ausgangsvolumens der Fermentationsbrühe beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das zur Resuspendierung des Schlammes verwendete Wasservolumen das etwa 1- bis etwa 3fache des Schlammvolumens beträgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die Brühe mit einem proteolytischen Enzym behandelt, bevor man sie zur Bildung eines Schlammes zentrifugiert, wobei das Enzym Riboflavin nicht beeinflusst, jedoch eine solche Wirkung besitzt, dass es entweder proteinhaltiges bzw. proteinartiges Material solubilisiert oder dieses Material zu einem durch Zentrifugieren abtrennbaren Material verminderter Dichte umwandelt.

15754IB

-3-

2920592

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man den resuspendierten Schlamm vor seiner Zentrifugierung mit einem proteolytischen Enzym behandelt.

-----  
COPY

- 3 -

030049/0112

2920592

DR.-ING. WALTER ABITZ  
DR. DIETER F. MORF  
DIPL.-PHYS. M. GRITSCHNEIDER  
Patentanwälte

München, 21. Mai 1979

Postanschrift / Postal Address  
Postfach 860109, 8000 München 86

Pienzenauerstraße 28  
Telefon 983222  
Telegramme: Chemindus München  
Telex: (0) 523992

- 4 -

15754IB

MERCK & CO., INC.  
Rahway, New Jersey, V.St.A.

---

Verfahren zur Reinigung von Riboflavin

---

030049/0112

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, durch welches man Riboflavin aus einer Fermentations- bzw. Gärbrühe gewinnt, indem man die Brühe mit einer vorbestimmten Wassermenge verdünnt, die verdünnte Brühe zur Bildung eines Schlammes zentrifugiert, den Schlamm mit einer vorbestimmten Wassermenge resuspendiert und den resuspendierten Schlamm zentrifugiert. Man erhält dabei ein Produkt, welches sich direkt als Tierfutterzusatz eignet oder für pharmazeutische Zwecke weiter gereinigt werden kann. Gegebenenfalls wird die Brühe oder der resuspendierte Schlamm vor der Zentrifugierung mit einem Enzym versetzt bzw. behandelt.

Das erfindungsgemäss verwendete Ausgangsmaterial ist eine Riboflavin-Fermentationsbrühe. Die Herstellung von Riboflavin aus einer Fermentations- bzw. Gärbrühe ist bekannt. Kurz gesagt, wird bei dieser Methode ein Nährmedium sterilisiert und mit einem zur Bildung von Riboflavin befähigten Mikroorganismus, wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* (ATCC Nr.10895), beimpft. Wenn die Fermentationsausbeute an den Maximalwert herankommt oder diesen Wert etwa erreicht, wird die Brühe etwa 15 bis etwa 45 Minuten (vorzugsweise etwa 25 bis etwa 35 Minuten) auf etwa 50 bis etwa 65°C erwärmt, wonach man mit der Riboflavingewinnung beginnt. Das Erwärmen dient zur Lyse der Zellen und Verminderung der Viskosität der Brühe, wodurch die Wirksamkeit der anschliessenden Gewinnungs- und Reinigungsstufen erhöht wird. Ein längeres als etwa 45-minütiges Erwärmen ist nachteilig, da es die Viskosität der Brühe eher erhöht als herabgesetzt.

Die Brühe wird dann abgekühlt und mit einer vorbestimmten Wassermenge verdünnt. Die gewählte Wassermenge reicht nicht zur Auflösung suspendierter Feststoffe in der Brühe aus, genügt jedoch für die Erzielung einer optimalen Zentrifugentrennung, indem sie sowohl die zuvor aufgelösten Feststoffe in der Brühe verdünnt als auch die Abtrennung fester, suspendierter Teilchen, die eine geringere Dichte als kristallines Riboflavin haben, fördert. Typischerweise beträgt diese zugesetzte Wassermenge etwa 25 bis etwa 100 Vol.-% des Volumens der Fermentationsbrühe, vorzugsweise etwa 1/3 bis etwa die Hälfte des Fermentationsbrühenvolumens.

Ein proteolytisches Enzym kann während des Erwärmens vorhanden sein oder nach dem Erwärmen zugesetzt werden. Man lässt das Enzym proteinartige bzw. -haltige Materialien mehrere Stunden (im allgemeinen 1 bis etwa 5 Stunden, vorzugsweise etwa 3 bis etwa 4 Stunden) digerieren. Während der Enzymbehandlung wird der pH auf einen Wert eingestellt, bei dem das Enzym die grösste Wirkung entfaltet; im allgemeinen liegt dieser pH-Wert im Bereich von etwa 6,0 bis etwa 9,0. Anschliessend kühlt man die Brühe ab und stellt den pH-Wert (falls er alkalisch ist) auf etwa 7,0 ein.

Die verdünnte Brühe wird dann entweder mit oder ohne Enzymbehandlung durch Zentrifugieren in einen Schlamm umgewandelt. Der Schlamm wird hierauf mit einer vorbestimmten Wassermenge resuspendiert. Die gewählte Wassermenge reicht nicht zur Auflösung suspendierter Feststoffe im resuspendierten Schlamm aus, genügt jedoch zur Optimierung der Abtrennung fester Teilchen mit einer geringeren Dichte als jener von kristallinem Riboflavin. Typischerweise beträgt diese Wassermenge etwa 1 Volumen bis etwa 3 Volumina, vor-

zugsweise etwa 2 Volumina, pro Volumen des Schlammes. Auf Feststoffbasis ausgedrückt, enthält der resuspendierte Schlamm etwa 15 bis etwa 30 Gew.-% Feststoffe. Der resuspendierte Schlamm wird dann zentrifugiert, wobei man ein Zentrifugat erhält, das als solches als Tierfutterzusatz geeignet ist.

Beispiele für Enzyme, welche sich für das erfindungsgemäße Verfahren eignen, sind alkalische Proteasen, wie *B. subtilis*-Protease, *B. ligninoformis*-Protease oder *B. amylofaciens*-Protease, und neutrale Proteasen, wie neutrale *B. subtilis*-Proteasen. Solche Enzyme sind im Handel erhältlich; ein geeignetes alkalisches Protease-enzym ist beispielsweise Rhozyme P-62 von Rohm and Haas Co. und ein geeignetes neutrales Proteaseenzym beispielsweise Enzeco Bacterial Protease von Enzyme Development Corp..

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch zu beschränken.

#### B e i s p i e l 1

Ein Liter einer Riboflavin-Fermentationsbrühe wird nach Beendigung der Fermentation 30 Minuten auf 60°C erhitzt. Anschliessend wird die Brühe auf 25°C abgekühlt und mit destilliertem Wasser auf 1,4 Ltr. verdünnt. Die verdünnte Brühe wird zentrifugiert und das Zentrifugat in 2 Volumina Wasser resuspendiert. Dann wird nochmals zentrifugiert. Die Reinheit des erhaltenen Zentrifugats ist dreimal so gross wie jene der unbehandelten getrockneten Fermentationsbrühe und reicht dafür aus, dass das Zentrifugat ohne weitere Behandlung als Tierfutterzusatz verwendet wird.

B e i s p i e l 2

Ein Liter einer Riboflavin-Fermentationsbrühe wird nach Beendigung der Fermentation auf 60°C erhitzt. Dann fügt man 0,068 g alkalische B. subtilis-Protease mit einer Aktivität von 3,65 Caseineinheiten hinzu und lässt 3 Stunden reagieren. Eine Caseineinheit ist definiert als die Fähigkeit von 1 g Enzym zur Solubilisierung von 270 g Azocasein in 1 Std. bei 40°C und einem pH-Wert von 8,0. Nach dem Erhitzen wird die Brühe auf 25°C abgekühlt, bis zum pH 7,0 neutralisiert und mit destilliertem Wasser auf 1,4 Ltr. verdünnt. Die verdünnte Brühe wird zentrifugiert und das Zentrifugat in 2 Volumina Wasser resuspendiert und neuerlich zentrifugiert. Die Reinheit des erhaltenen Zentrifugats ist um 20 % grösser als in Beispiel 1.

B e i s p i e l 3

Eine Probe einer Riboflavin-Fermentationsbrühe wird exakt wie in Beispiel 2 aufgearbeitet, ausser dass man 0,48 g einer alkalischen B. ligninoformis-Protease mit einer Aktivität von 3 Ansoneinheiten anstelle der alkalischen B. subtilis-Protease verwendet. Eine Ansoneinheit ist definiert als die durch 1 g des Enzyms innerhalb von 10 Minuten bei 25°C und einem pH-Wert von 10,1 digerierte Grammanzahl von Hämoglobin, welche durch Trichloressigsäurezugabe nicht ausgefällt werden. Die Reinheit des enzymbehandelten Schlammes ist um 27 % grösser als jene des nicht-enzymbehandelten Schlammes. Die Reinheit des enzymbehandelten Schlammes ist 3,4mal so gross wie jene der un behandelten getrockneten Fermentationsbrühe.

Die Enzymbehandlung der Fermentationsbrühe kann gleichzei-

tig mit einem Hitzesterilisierungszyklus im Fermentationsgefäß durchgeführt werden, wobei ähnliche Resultate erzielt werden.

#### Beispiel 4

553 ml einer pasteurisierten Riboflavin-Fermentationsbrühe werden mit 10 ml einer Nährbrühen-Impfkultur von *B. subtilis* (National Collection Type Culture No. 3610) inkuliert. Man lässt die Fermentation 48 Stunden bei 37°C weiter erfolgen. Während der Fermentation nimmt der Anteil der suspendierten Feststoffe um 72 % ab. Die mit *B. subtilis* fermentierte Brühe wird dann erhitzt, mit Wasser auf 750 ml verdünnt und zentrifugiert. Das Zentrifugat wird in 200 ml Wasser suspendiert und neuerlich zentrifugiert. Die Reinheit des Zentrifugats ist um 53 % grösser als jene einer nicht mit *B. subtilis* fermentierten Vergleichsprobe und 4,4 mal so gross wie jene der getrockneten Fermentationsbrühe.

#### Beispiel 5

Die Arbeitsweise von Beispiel 1 wird mit der Ausnahme wiederholt, dass das resuspendierte Zentrifugat vor der Zentrifugierung auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und auf 60°C erhitzt wird. 0,049 g alkalisches *B. subtilis*-Proteaseenzym mit einer Aktivität von 3,65 Caseineinheiten werden zugesetzt und während 3 Stunden reagieren gelassen. Dann wird die Aufschämmung abgekühlt, neutralisiert und zentrifugiert. Die Reinheit des Zentrifugats ist um 41 % grösser als jene einer Vergleichsprobe, die keiner Enzymbehandlung unterworfen wird. Eine an derselben Brühe derselben Fermentationscharge durchgeführte, äquivalente Enzymbehandlung ergibt einen um nur 20 % gegenüber den Vergleichsproben erhöhten Reinheitsgrad.

Ende der Beschreibung

- 5 -